基出研究

STOML-2过表达抑制人宫颈鳞癌Siha细胞凋亡

胡国林[1],姚广裕[1],邓 欢[2],赵可雷[3],许斐斐[1],梁卫江[1],刘国炳[1]

[1]南方医科大学南方医院,广东 广州 510515;[2]南方医科大学第三附属医院,广东 广州 510631;[3]新乡医学院第一附属医院,河南 新乡 453199

摘要:目的 研究STOML-2过表达抑制人宫颈鳞癌Siha细胞凋亡的机制,以期为宫颈癌的治疗开辟新的路径。**方法** 用携带STOML-2基因的腺病毒感染Siha细胞作为过表达组,同时设立空白载体组及空白组作为对照,72 h后用Western blot检测STOML-2的过表达,并用MTT法检测STOML-2过表达对细胞增殖的影响。用IC_{50}的顺铂处理各组细胞24 h后,利用荧光显微镜观察STOML-2过表达对细胞凋亡的影响,并利用流式细胞仪进一步分析细胞的凋亡率;采用Western blot检测线粒体凋亡途径相关蛋白caspase3、cleaved-caspase3、Bcl-2、Bax以及线粒体内外细胞色素C(Cyt C)表达量的变化。**结果** 与空白组及空白载体组相比,Western blot结果显示过表达组STOML-2的表达量明显增加;MTT结果显示,STOML-2过表达后可明显促进Siha细胞的增殖。用IC_{50}的顺铂处理细胞24 h后,荧光显微镜下,空白载体组凋亡细胞的细胞核大小不一,浓染致密的蓝色荧光显示核固缩,部分核裂解为凋亡小体,而过表达组细胞核多较完整,着色较浅,染色质密度均匀一致,并且流式细胞仪结果同样提示STOML-2过表达后细胞凋亡率明显降低。Western blot结果显示过表达组线粒体凋亡途径相关蛋白cleaved-caspase3、Bax以及线粒体外Cyt C表达水平降低,而caspase3、Bcl-2及线粒体内Cyt C的表达水平则相应升高。**结论** STOML-2过表达可以促进Siha细胞增殖,其抑制凋亡的机制可能与线粒体凋亡途径相关。

关键词:宫颈鳞癌;STOML-2;线粒体凋亡途径

Overexpression of STOML-2 inhibits apoptosis of human cervical squamous carcinoma Siha cells *in vitro*

HU Guolin[1], YAO Guangyu[1], DENG Huan[2], ZHAO Kelei[3], XU Feifei[1], LIANG Weijiang[1], LIU Guobing[1]

[1]Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; [2]Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510631, China; [3]The First Affiliated Hospital Of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453199 China

Abstract: Objective To investigate the mechanism underlying the inhibitory effect of STOML-2 overexpression on apoptosis of human cervical squamous carcinoma Siha cells. **Methods** Siha cells were transfected with an adenoviral vector carrying STOML-2, and 72 h later STOML-2 expression and the proliferation of the cells were detected by Western blotting and MTT assay. The transfected cells were treated with IC_{50} Cisplatin for 24 h, and the morphological changes of cells were observed using fluorescence, and the cell apoptosis was analyzed using flow cytomerty; the expression levels of proteins related with mitochondrial apoptosis pathway, including caspase-3, cleaved caspase-3, Bcl-2, Bax and cytochrome C (Cyt C), were detected by Western blotting. **Results** Western blotting showed a significantly increased STOML-2 expression in the transfected cells. Overexpression of STOML-2 obviously promoted the proliferation of Siha cells. The STOML-2-overexpressing cells exhibited an obvious resistance to IC_{50} Cisplatin-induced apoptosis as shown by both fluorescence microscopy and flow cytometry and presented with decreased expressions of cleaved caspase-3, Bax, and cytosol Cyt C and increased expressions of caspase-3, Bcl-2, and mitochondrial Cyt C. **Conclusion** Overexpression of STOML-2 can enhance the proliferation of Siha cells by inhibiting cell apoptosis possibly through the mitochondrial apoptosis pathway.

Key words: cervical squamous carcinoma; STOML-2; mitochondrial apoptosis pathway

STOML-2是stomatin家族的新成员,具有stomatin家族共有的一致序列,但不具有N端跨膜区域,因此,STOML-2发挥功能的机制可能与其他成员不同[1-2]。STOML-2定位于线粒体内膜,其在食管癌、肺癌、子宫内膜癌等多种肿瘤均高表达[3-4],但其在宫颈癌组织中表达量的高低文献报道不一[5-9]。我们实验室采用免疫组化、Real time-PCR以及Western blot检测宫颈癌组织中的表达情况,发现癌组织中STOML-2的表达都比对应的癌旁组织高[8],但对其抑制宫颈癌细胞凋亡的机制尚未进行研究,且国内外均未见相关报道。本实验以人宫颈鳞癌Siha细胞为研究对象,以腺病毒为载体介导STOML-2过表达,研究其对细胞增殖的影响以及抑制宫颈癌细胞凋亡的机制。

收稿日期:2015-05-12

基金项目:广东省自然科学基金(S2013010016194)

作者简介:胡国林,硕士,E-mail: 464033541@qq.com

通信作者:梁卫江,博士,主任医师,E-mail: wjliang22@126.com;刘国炳,主任医师,E-mail: lgb@fimmu.com

1 材料和方法

1.1 材料

人宫颈鳞癌Siha细胞由南方医院肿瘤科实验室惠赠，RPMI 1640培养基（Hyclone），四季青胎牛血清（杭州四季青生物制品公司），STOML-2腺病毒及空载体腺病毒（美国ViGene Biosciences），顺铂（江苏豪森药业），MTT（Sigma），Hoechst33258（武汉谷歌生物），兔抗人α-tubulin（enogene）、兔抗人caspase3及cleaved-caspase3抗体（CST）、兔抗人Cytochrome C、Bcl-2、Bax抗体（abcam）、羊抗兔荧光二抗（LI-COR）。

1.2 方法

1.2.1 *Siha细胞及其培养* 将Siha细胞常规培养于含体积分数为10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中，在37 ℃、饱和湿度及含5% CO_2的培养箱中传代培养。

1.2.2 *腺病毒感染Siha细胞* 将Siha细胞按照20万/孔接种于6孔板上，过夜细胞贴壁后换液，按MOI（multiplicity of infection）=50将腺病毒加入完全培养基中感染细胞，72 h后提取全蛋白，采用Western blot检测STOML-2的表达。

1.2.3 *MTT法检测STOML-2过表达后对细胞增殖的影响* 取对数生长期的Siha细胞，将细胞按7000/孔接种于96孔板上，每孔200 μL完全培养基，设5个复孔，按MOI=50将腺病毒加入全培中感染细胞，72 h后每孔加入20 μL浓度为5 mg/mL的MTT溶液，避光、37 ℃孵育4 h，小心去掉孔内培养液，每孔加入150 μL DMSO，置摇床上低速振荡10 min，使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪测定吸光值（X=490 nm），实验重复3次以上。

1.2.4 *MTT法检测顺铂的IC_{50}* 取对数生长期的Siha细胞，将细胞按7000个/孔接种于96孔板上，每孔200 μL完全培养基，设5个复孔，72 h后换成顺铂终浓度为0、2.5、5、10、20、30、40、50、60 μg/mL的完全培养基，继续培养24 h后每孔加入20 μL浓度为5 mg/mL的MTT溶液，避光、37 ℃孵育4 h。小心去掉孔内培养液，每孔加入150 μL DMSO，置摇床上低速振荡10 min，使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪测定吸光值（X=490 nm），抑制率（%）=（处理组-调零孔）/（对照组-调零孔）×100%，取其平均值。实验重复3次以上。

1.2.5 *Hoechst 33258染色观察细胞形态* 取对数生长期的Siha细胞，将细胞按7000/孔接种于96孔板上，每孔200 μL完全培养基，设3个复孔，按MOI=50将腺病毒加入全培中感染细胞，48 h后换成顺铂终浓度为15 μg/mL的完全培养基，继续培养24 h后，去上清，室温下用4%多聚甲醛固定液固定30 min，用PBS洗涤3次，每孔加入50 μL的Hoechst33258避光条件下染色15 min，再用PBS洗涤3次，在荧光显微镜下观察细胞核形态变化。

1.2.6 *流式细胞仪检测细胞凋亡率* 取对数生长期的Siha细胞按照20万/孔接种于6孔板上，过夜细胞贴壁后换液，按MOI=50将腺病毒加入全培中感染细胞，72 h后换成顺铂终浓度为15 μg/mL的完全培养基，继续培养6 h后，收集细胞，用AnnexinV-FITC和PI标记，用流式细胞仪检测，分析凋亡细胞的比例。

1.2.7 *Western blot分析* 取对数生长期的Siha细胞按照100万/皿接种于大皿，过夜细胞贴壁后换液，按MOI=50将腺病毒加入全培中感染细胞，72 h后换成顺铂终浓度为15 μg/mL的完全培养基，继续培养24 h后，按照全蛋白试剂盒和细胞线粒体分离试剂盒收集并裂解细胞，得到细胞全蛋白、线粒体蛋白及胞浆蛋白，用BCA法对蛋白样品进行定量。取等量蛋白样品用12% SDS-PAGE进行电泳，恒压将蛋白转至PVDF膜。室温下将膜在含5%脱脂奶粉的TBST溶液中封闭1 h，按照适当的稀释度加入一抗，4 ℃孵育过夜，荧光二抗室温孵育1 h，应用Western bolt检测系统测定caspase3、cleaved-caspase3、Bcl-2、Bax以及线粒体内外Cyt C的表达水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS20.0统计软件，实验数据以均数±标准差表示，组间比较采用单因素方差分析，P<0.05认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒感染Siha细胞后STOML-2的表达

Western bolt结果如图1所示，用携带STOML-2基因的腺病毒转染Siha细胞72 h后STOML-2的表达明显增加，说明外源性的STOML-2基因可以在Siha细胞中过表达。

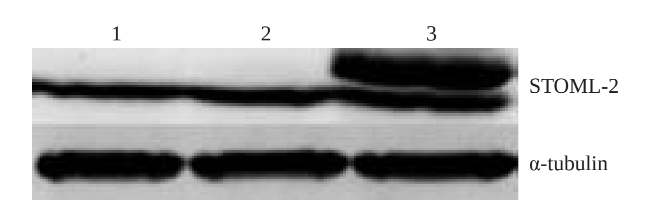


图1 腺病毒感染Siha细胞72 h后STOML-2的表达

Fig.1 Expression of STOML-2 after transfection in Siha cells. 1: Blank group; 2: Empty vector transfection group; 3: Overexpression group.

2.2 STOML-2过表达对细胞增殖的影响

MTT结果显示，STOML-2过表达后明显促进Siha细胞的增殖，同空白组和空载体组相比，结果具有显著统计学差异（0.545±0.080 *vs* 0.548±0.010 *vs* 0.636±0.057，P<0.0001），而空白组与空载体组无统计学差异。

2.3 MTT法检测顺铂的IC_{50}

用不用浓度的顺铂处理Siha细胞24 h后，MTT结果显示，随着顺铂浓度的增加，其对Siha细胞的杀伤率越来越高（图2），计算得IC_{50}≈15 μg/mL。

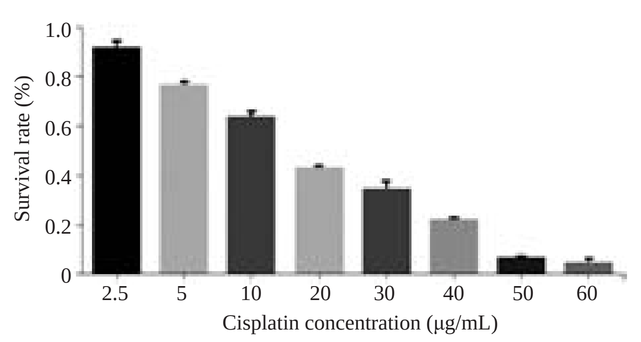


图2 不同浓度的顺铂对Siha细胞的杀伤作用

Fig.2 Changes in the viability of Siha cells after treatment with cisplatin.

2.4 Hoechst33258染色检测细胞凋亡

细胞发生凋亡时往往出现细胞核形态的改变。用终浓度为15 μg/mL的顺铂处理Siha细胞24 h后，其Hoechst33258染色结果如图3所示，空白组和空载体组细胞表现为凋亡细胞的细胞核大小不一，浓染致密的蓝色荧光显示核固缩，部分核裂解为凋亡小体，而过表达组细胞核多较完整，着色较浅，染色质密度均匀一致，说明经同浓度的顺铂处理后STOML-2过表达组细胞凋亡减少。

2.5 流式细胞仪结果分析

用终浓度为15 μg/mL的顺铂作用于Siha细胞6 h后，收集细胞，采用AnnexinV-FITC/PI双染，上机检测细胞凋亡。结果如图4所示，与空白组及空载体组相比，过表达组早期凋亡率明显减少且具有统计学差异(36.30±5.72 *vs* 39.77±7.34 *vs* 9.10±5.16，$P<0.01$)，且总凋亡率也明显减少且具有统计学差异(51.40±4.80 *vs* 61.53±7.17 *vs* 20.30±9.96，$P<0.01$)，空白组与空载体组相比早期凋亡率及总凋亡率均无统计学差异。

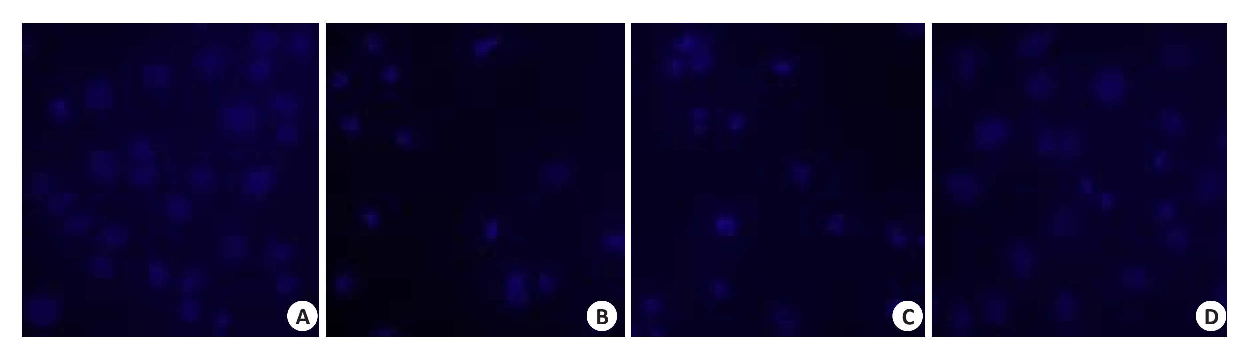


图3 荧光显微镜下观察STOML-2过表达后对Siha细胞形态的影响

Fig.3 Fluorescence microscope of morphological changes of Siha cells after Cisplatin exposure (Original magnification: ×400). *A*: Blank group; *B*: Blank group+Cisplatin; *C*: Empty vector transfection group+Cisplatin; *D*: Everexpression group+Cisplatin.

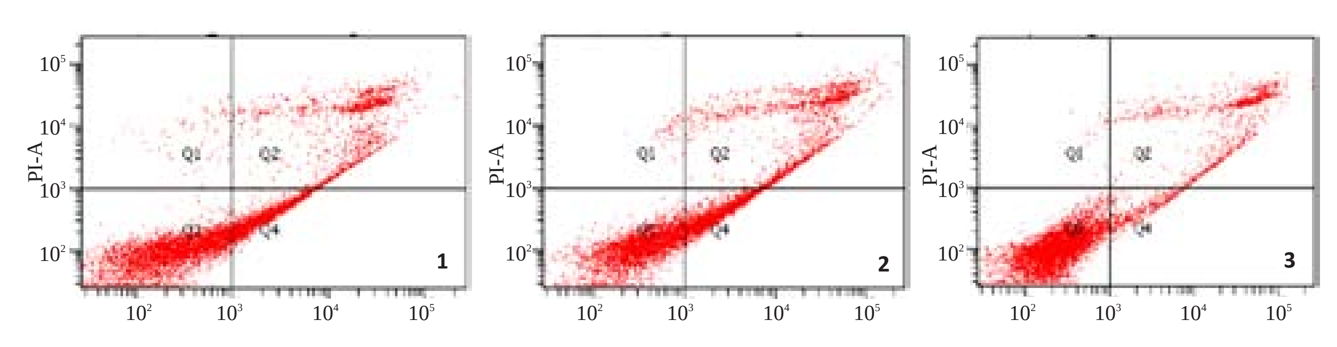


图4 Annexin V-FITC/PI双染流式细胞分析

Fig.4 Flow cytometry analysis for Annexin V-FITC/PI staining. 1: Blank group+Cisplatin; 2: Empty vector transfection group+Cisplatin; 3: Overexpression group+Cisplatin.

2.6 western blot检测线粒体凋亡途径相关蛋白的变化

如图5，6所示，经顺铂作用24 h后，与空白组和空载体组相比，过表达组与凋亡直接相关的cleaved-caspase3、线粒体外Cyt C及Bax的表达水平降低，而对应的caspase-3、线粒体内Cyt C及Bcl-2的表达水平则升高。

3 讨论

STOML-2在食管癌、肺癌、子宫内膜癌及宫颈癌等多种恶性肿瘤广泛高表达[3-4]，说明了其在恶性肿瘤的发生、发展中起着重要作用。我们使用腺病毒感染宫颈鳞癌Siha细胞后MTT结果提示STOML-2过表达可以促

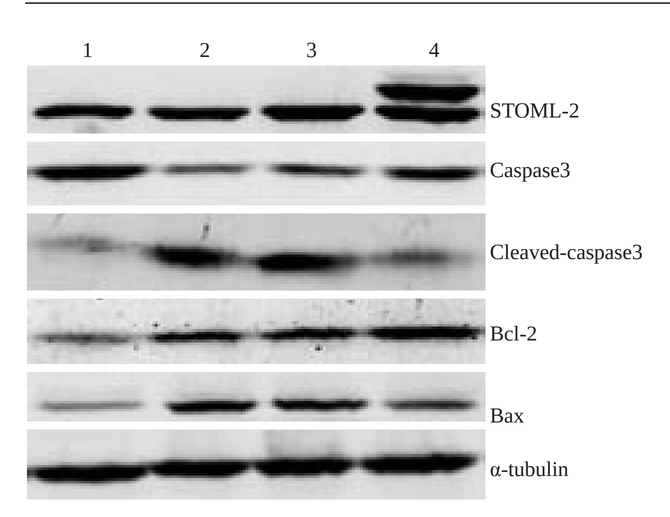


图5 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达

Fig.5 The expression of apoptosis-related proteins in Siha cells detected by Western blot. 1: Blank groupl 2: Blank group+Cisplatin; 3: Empty vector transfection group+Cisplatin; 4: Overexpression group+Cisplatin.

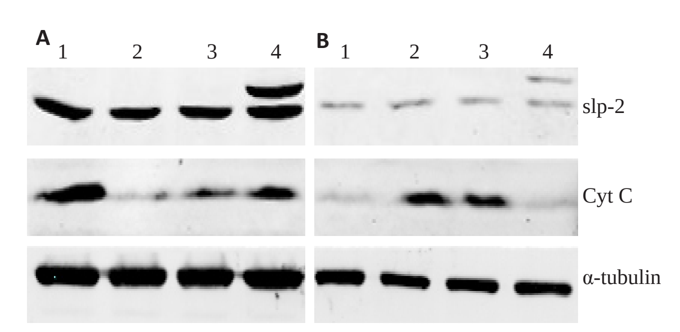


图6 Western blot 检测线粒体内外细胞色素C的表达

Fig.6 Levels of Cyt-C releas from mitochondria to cytosol in Siha cells detected by Western blotting. 1: Blank group; 2: Blank group+Cisplatin; 3: Empty vector transfection group+Cisplatinl 4: Overexpression group+Cisplatin. *A*: Mitochondria; *B*: Cytosol.

进Siha细胞的增殖。用顺铂诱导各组细胞凋亡后用Annexin V法检测显示过表达组早期凋亡率及总凋亡率均明显低于对照组，而我们以前用HeLa、HCC94细胞株沉默STOML-2后早期凋亡率及总凋亡率均明显高于对照组，说明STOML-2在宫颈鳞癌细胞中起着抑制凋亡的作用，而STOML-2抑制肿瘤细胞凋亡的机制，国内外均未见相关报道。

Rezaul等[10]研究发现STOML-2存在于线粒体内。随后，两个独立的研究小组[11-12]进一步报道STOML-2定位于线粒体内膜，本实验通过提取线粒体内外蛋白采用Western blot也同时证实了STOML-2主要存在于线粒体内。在哺乳类动物的细胞中线粒体通路是凋亡发生时的主要信号通路，在发生细胞外应激和细胞内损伤如DNA损伤时启动[13]。当细胞受到细胞内外的凋亡诱因刺激启动线粒体凋亡途径时，Bcl-2/Bax介导的线粒体外膜通透(MOMP)使线粒体内一些可溶性的蛋白如Cyt C从线粒体内膜释放至细胞质内。Cyt C结合至单体的凋亡蛋白酶激活因子Apaf-1，进而使得Apaf-1的空间构象发生改变并聚合为多聚体结构。Caspase-9前体与Apaf-1多聚体结合形成凋亡体，凋亡体的形成能激活Caspase-9，通过Caspase-9介导的蛋白裂解作用，最终激活了Caspase-3，诱导细胞凋亡的发生。

本实验进一步用顺铂处理STOML-2过表达的Siha细胞后检测线粒体凋亡途径相关蛋白的变化，结果显示STOML-2过表达后Bax/Bcl-2的比率降低，从线粒体释放到胞浆中的细胞色素C减少，使cleaved-caspase3也减少，说明STOML-2过表达可以抑制肿瘤细胞的凋亡，并且其抑制细胞凋亡的机制可能是通过线粒体凋亡途径进行。

综上所述，STOML-2过表达可以促进Siha细胞的增殖，STOML-2可能通过线粒体凋亡途径抑制肿瘤细胞的凋亡，更为完整的机制有待进一步实验证实。

参考文献：

[1] Owczarek CM, Treutlein HR, Portbury KJ, et al. A novel member of the STOMATIN/EPB72/mec-2 family, stomatin-like 2 (STOML2), is ubiquitously expressed and localizes to HSA chromosome 9p13.1[J]. Cytogenet Cell Genet, 2001, 92(3/4): 196-203.

[2] Dunphy JT, Linder ME. Signalling functions of protein palmitoylation[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1436(1/2): 245-61.

[3] Zhang L, Ding F, Cao W, et al. Stomatin-like protein 2 is overexpressed in Cancer and involved in regulating cell growth and cell adhesion in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(5): 1639-46.

[4] Cao W, Zhang B, Liu Y, et al. High-level SLP-2 expression and HER-2/neu protein expression are associated with decreased breast Cancer patient survival[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 128(3): 430-6.

[5] 吴 郁. SLP-2基因在宫颈鳞癌组织中的表达及其功能的初步研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006.

[6] 郑 烨. 组织芯片法检测新基因SLP-2在宫颈癌组织中的表达及意义[D]. 青岛: 青岛大学, 2008.

[7] 刘雪梅, 马 琳. SLP-2在宫颈腺癌中的表达及其临床意义[J]. 职业与健康, 2011, 27(10): 1195-7.

[8] 邓 欢. STOML-2在宫颈癌中的表达及其功能研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.

[9] 杨 晓, 刘玉玲, 胡晓军, 等. MTA1和SLP-2蛋白在宫颈鳞癌中的表达及相关性[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(11): 1800-2.

[10] Rezaul K, Wu L, Mayya V, et al. A systematic characterization of mitochondrial proteome from human T leukemia cells[J]. Mol Cell Proteomics, 2005, 4(2): 169-81.

[11] Hájek P, Chomyn A, Attardi G. Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2[J]. J Biol Chem, 2007, 282(8): 5670-81.

[12] Da Cruz S, Parone PA, Gonzalo P, et al. SLP-2 interacts with prohibitins in the mitochondrial inner membrane and contributes to their stability[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1783(5): 904-11.

[13] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-6.

（编辑：孙昌朋）